

WPI search for German patent DE 2051715

?b 351

19mar02 15:10:52 User235086 Session D4930.1  
Sub account: 04950201/MJS/MAR/ENGLISH ABSTRAC

File 351:Derwent WPI 1963-2001/UD,UM &UP=200218

(c) 2002 Derwent Info Ltd

\*File 351: Please see HELP NEWS 351 for details about U.S.  
provisional  
applications.

Set	Items	Description
---	-----	-----
?s pn=de 2051715		
S1	1	PN=DE 2051715

?t s1/7/all

1/7/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2002 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

000869461

WPI Acc No: 1972-29438T/ 197219

Continuous deflection electrophoresis - in chamber of nonplanar  
cross  
section

Patent Assignee: MAX PLANCK GES FOERDERUNG WISSENSCHAFTEN (PLAC )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 2051715	A					197219 B
DE 2051715	B	19760115				197604

Priority Applications (No Type Date): DE 2051715 A 19701021; DE  
2615332 A  
19760408

Abstract (Basic): DE 2051715 A

Separating chamber for continuously deflection electrophoresis in  
a buffer flow, with inlets and outlet for the electro-buffer, the  
chamber buffer and the substance to be separated, is arranged so that  
the separating chamber between the electrodes is not flat in cross-  
section, but has one or more angles or curves in it. Specif the  
separation chamber is built up of an internal block, external block  
and electrode block clamped together with seals and electrode  
membranes between the electrode block and the other two. The  
arrangement enables the chamber to be varied in its dimensions.

Derwent Class: J03

International Patent Class (Additional): B01K-005/00; C25X-000/00

BEST AVAILABLE COPY

**No title available.**

Patent Number: DE2051715  
Publication date: 1972-04-27  
Inventor(s):  
Applicant(s):: MAX PLANCK GESELLSCHAFT  
Requested Patent: ☒ DE2051715  
Application Number: DE19702051715 19701021  
Priority Number(s): DE19702051715 19701021  
IPC Classification:  
EC Classification: G01N27/447B, G01N27/447C3  
Equivalents:

**Abstract**

Data supplied from the esp@cenet database - I2

Translation of page 9, lines 5-11 of DE 2051715

According to a preferred embodiment of the invention one fills into the electrode compartments which are separated from the separation chamber by appropriate membranes appropriate liquids the acidity of which (anodic compartment) and basicity (cathodic compartment) limits the desired range of the pH gradient; e.g., pH range 4-8, anodic compartment 1 % phosphoric acid, cathodic compartment 1.5 % aqueous ethanolamino solution.

## Description

Trennkammer für die kontinuierliche Ablenkung elektrophorese

Die Erfindung betrifft eine Trennkammer für die kontinuierliche Ablenkungselektrophorese im trägerfreien Pufferstrom, mit Elektroden, mit einer Trennkammer und Zu- und Ableitungen für den Elektrodenpuffer, den Kammerpuffer und die zu trennende Substanz.

Für die kontinuierliche elektrophoretische Trennung im freien Pufferstrom sind eine Reihe von Trennkammern entwickelt worden, die fast ausnahmslos auf folgendem Prinzip beruhen: Zwischen zwei planparallelen Platten wird ein Puffervorhang der Dicke  $d$  gleichmässig in Fall richtung bewegt. In den Pufferstrom wird an einer Stelle kontinuierlich das zu trennende Substanzgemisch injiziert, das als Streifen der Bandbreite  $a$  lotrecht z.u., den planparallelen Platten herunterwandert. Unter dem Einfluss eines elektrischen Gleichstromfeldes, dessen Feldlinien horizontal verlaufen, werden die Substanzpartikel je nach ihrer Ladung abgelenkt. Ihre Wanderungswege bilden mit der Flussrichtung des Pufferstroms Winkel, deren Grösse von den spezifischen Eigenschaften der Partikel, der Feldstärke und der Pufferflussgeschwindigkeit abhängt. Die Bandbreite  $a$  ist durch den Querschnitt der Kammer und durch das Verhältnis aus Dosiergeschwindigkeit des Substanzgemisches und der Pufferflussgeschwindigkeit (Dosierverhältnis) gegeben. Sie vergrössert sich während der Trennung durch Diffusion, Turbulenz, Elektroosmose und Thermokonvektion. Die Bedingung für die vollständige Trennung zweier Substanzen ist erfüllt, wenn zum Zeitpunkt der Entnahme die Bandbreiten einander nicht überlappen und wenn die wirksame Breite  $b$  einer einzelnen Entnahmerichtung keiner ist als der Abstand zwischen den einzelnen Bändern an der Entnahmestelle. Die Abmessungen der Trennkammern bekannter Geräte sind beispielsweise  $L \times B \times d = 50 \times 50 \times 0,05$  cm oder  $50 \times 10 \times 0,05$  cm. Ferner werden auch Geräte mit Trennkammern verwendet, deren Abmessungen bei  $L = 18$  bis  $45$  cm,  $B = 2,5$  bis  $5,0$  cm und  $d = 0,15$  cm liegen.

Bei den bekannten Geräten kann wegen der in der Nähe der Elektroden auftretenden Inhomogenitäten des elektrischen Feldes nicht die gesamte Trennkammerbreite ausgenutzt werden, so dass das Gerät breiter ausgeführt werden muss, als dies bei maximaler Ausnutzung der zur Verfügung stehenden Trennkammerbreite eigentlich notwendig wäre. Ferner ist das Problem, Kammerplattenpaare dieser Grösse, die zudem noch von allen vier Seiten aus durch die Elektroden- und Pufferzuführungs- bzw. Absaugvorrichtung unter recht hohe mechanische Spannung gesetzt werden, präzise im richtigen Abstand  $d$  zu halten und gegen Pufferdruckschwankungen zu stabilisieren, technisch nur sehr aufwendig zu lösen und da her Ursache erhöhter Störanfälligkeit. Auch ist das grosse Eigenvolumen der Trennkammer bei Arbeiten mit kleinen Probenlängen sehr nachteilig. So ist es kaum möglich, die Verweilzeit der Substanz in der Kammer kürzer als etwa 30 Minuten zu halten, wodurch insbesondere Arbeiten mit empfindlichen Substanzen behindert werden.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine Trennkammer zu schaffen, die mit wenigen Handgriffen montierbar und in ihren Hauptabmessungen variabel ist, die ferner mechanisch so stabil ist, dass zum Beispiel Änderungen des Pufferdrucks und ungleiches Anpressen der Dichtungen keinen Einfluss auf die Form der Kammer haben. Zudem sollen bei kleinem Eigenvolumen hohe Feldstärken, intensive Kühlung und grosse Pufferflussgeschwindigkeiten erreichbar sein.

Die erfindungsgemässe Trennkammer zeichnet sich dadurch aus, dass sie zwischen den Elektroden einen nicht ebenen, einfach oder mehrfach gewinkelten oder gewölbten Querschnitt besitzt.

Bei dieser Ausführungsform kann beispielsweise die wirksame Fläche der Trennkammer in eine Ebene gelegt werden, während die unwirksamen Teile der Trennkammer in einer dazu unterschiedlichen Ebene liegen, so dass insgesamt die tatsächliche Breite der Kammer wesentlich verringert werden kann.

Zweckmässig ist es hierbei, die Elektroden in einem gemeinsamen Block zusammenzufassen, so dass die Elektroden praktisch eine Einheit bilden.

Die Innenfläche der Trennkammer kann dadurch einen Innenblock und ihre Aussenfläche durch einen Aussenblock gebildet werden. Dabei sind Innenblock, Aussenblock und Elektrodenblock zur Aufnahme von Kühlvorrichtungen vorgesehen. Besitzt die Trennkammer beispielsweise einen U-förmigen

Querschnitt, so kann der Aussenblock aus einem Frontblock und zwei Seitenblöcken, und der Innenblock aus einem Kühlblock bestehen.

Aussen- und Innenblock werden zweckmässigerweise über Dichtungen und Elektrodenmembranen auf den Elektrodenblock gepresst, wobei die elektrodenseitigen Kammerenden über den Schlitten der Elektrodenräume liegen.

Um eine genaue Einstellung der Plattenstärke zu ermöglichen, ist es zweckmässig, die einzelnen Blöcke so auszubilden, dass Aussenblock und Innenblock getrennt auf den Elektrodenblock gepresst werden können. Dabei kann im Fall einer U-förmigen Kammer ein durch den Elektrodenblock in den Kühlblock führender Spannbolzen H vorgesehen werden, der den Kräften entgegen wirkt, die eine Verringerung der Kammerdicke bewirken würden.

Aussen- und Innenblock können aus jeweils einem oder mehreren Teilen bestehen, durch deren gegenseitige Verschiebung Trennkammern variabler Dicke und Form hergestellt werden können.

Um auch die Elektroden möglichst schnell und einfach auszuwechseln zu können, werden vorteilhafterweise die Elektroden in die Elektrodenräume einsteckbar ausgeführt, wobei die Steckverbindungen die Abdichtung des Elektrodenkanals und die Justierung der Elektroden in den Elektrodenräumen bewirken.

Die erfindungsgemässe Trennkammer lässt sich einfach und schnell zusammenbauen und mittels weniger Einzelteile in ihren Hauptabmessungen einfach und schnell verändern. Aufgrund ihres Aufbaues ist die Trennkammer mechanisch so stabil, dass Änderungen des Pufferdrucks und ungleiches Anpressen der Dichtungen keinen Einfluss auf die Form der Kammer haben. Das Volumen des gesamten Gerätes kann durch den unebenen Aufbau der Trennkammer auf das unbedingt notwendige Minimum verringert werden und es sind zudem hohe Feldstärken, intensive Kühlung und grosse Pufferflussgeschwindigkeiten möglich.

Insbesondere ist bei U-förmigem Querschnitt der Trennkammer eine sehr einfache Bauweise derselben möglich, die eine grosse Präzision der Kammerform zulässt und eine grosse mechanische Stabilität bietet. Hierdurch brauchen Kammerpufferzu- und abfluss nicht synchronisiert zu werden und es können Niveaufässer gleichen Querschnitts für die Pufferzuführung verwendet werden. Die Befürchtung, dass die Ablenkung der Substanzstreifen bei dieser Kammerform in ungünstiger Weise beeinflusst würde, ist deshalb unbegründet, weil normalerweise die ebene Stirnfläche der Kammer für die Trennungen benutzt wird. Da auch in den planar angeordneten Kammern elektrodennahe Regionen wegen dort vorhandenen pH-Verschiebungen des Puffers ohnehin vermieden werden müssen, ist der für die Trennungen nutzbare Bereich der eckigen und ebenen Kammern gleicher Breite vergleichbar.

Anhand von Versuchen konnte festgestellt werden, dass die um die Ecke herum wandernden Substanzstreifen in ihrer Form und ihrem Ablenkungswinkel unbeeinflusst bleiben.

Als wesentlicher Vorteil der erfindungsgemässen Kammerkonstruktion ist ferner die gemeinsame Anordnung der beiden Elektroden in einem Block zu betrachten. Der sonst zur Reinigung der Kammer, zum Austausch der Elektrodenmembranen usw. erforderliche Arbeits- und Zeitaufwand entfällt hierdurch zu einem grossen Teil. Darüberhinaus wird mit Hilfe des Entlastungsbolzens der Aufbau einer Trennkammer ermöglicht, die nahezu frei von Zug- und Druckkräften ist. Vorteilhaft ist ferner die leichte Zugänglichkeit der Elektroden. Die besondere Konstruktion des Elektrodenblocks und die nicht planare Anordnung der Trennkammer erlaubt es aber auch, Kammern verschiedenster Formen aufzubauen. So kann beispielsweise bei vorgegebenem Abstand der Elektrodenkanäle das Seitenverhältnis der Kammer durch Variation der Seitenblöcke verändert und damit die Kammerbreite variiert werden. Um eine möglichst schmale Kammer herzustellen, kann der Kühlblock zum Beispiel durch eine mechanisch genügend stabile Glasplatte ersetzt und der Raum zwischen Elektrodenblock, Dichtungsleisten und Glasplatte als Kanal für die Kühlflüssigkeit benutzt werden. Die Kunststofftechnologie erlaubt es ferner, mit einfachen Mitteln Kammern auch mit nicht ebenen Begrenzungsflächen herzustellen. Wenn Giess- oder Spritzverfahren angewendet werden und der Kühlblock als negative Form benutzt wird, ist die Konstanz der Kammerdicke bei beliebigen Kammerformen in hohem Masse gewährleistet.

Die Grösse der erfindungsgemässen Trennkammer ist konstruktiv nicht eingeschränkt. Sie kann in weiten Grenzen variiert werden.

Die Ablenkung einer gegebenen Substanz kann in sehr weiten Grenzen durch die Wahl von Pufferflussgeschwindigkeit und Feldstärke variiert werden. So sind beispielsweise bei der erfindungsgemässen Trennkammer unter Verwendung üblicher Puffersysteme Trennungen bei Feldstärken von 80 bis 120 V/cm im Dauerbetrieb möglich. Um Turbulenz der Strömung zu vermeiden und möglichst kreisrunde, von Wandeffekten unbeeinflusste Substanzstreifen zu erzielen, haben sich Kammerdicken von 0,5 bis 1 mm als optimal herausgestellt.

Da in der Mehrzahl der Trennprobleme geringe Verweilzeiten in der Kammer und hohe Durchsatzraten wünschenswert sind, kann für die Absaugvorrichtung ein Antriebsmotor vorgesehen werden, der Durchflussgeschwindigkeiten von 3 bis 20 ml/Minute erlaubt. Dies entspricht Verweilzeiten von 7 bis 1 Minute in der Kammer. Für besondere Trennungen, zum Beispiel in Ampholytgradienten sind geringe Flussgeschwindigkeiten erwünscht. Sie werden durch einen zweiten, leicht austauschbaren Antriebsmotor mit geringen Laufgeschwindigkeiten erzielt. Das kleine Kammervolumen ist für derartige Trennungen gleichzeitig ein erheblicher wirtschaftlicher Vorteil.

Anhand der in der beigefügten Zeichnung dargestellten bei spiel zwei sen Ausführungsform wird die Erfindung im folgenden näher erläutert. Es zeigen: Fig. 1 eine schematische Darstellung zur Erläuterung der prinzipiellen Wirkungsweise der Kammer; Fig. 2 einen Horizontalschnitt durch eine erfindungsgemäss ausgebildete Trennkammer; und Fig. 3 einen Vertikalschnitt durch die in Fig. 2 gezeigte Trennkammer. Fig. 1 zeigt eine Trennkammer mit den Abmessungen B und L, bei der sich zwischen zwei planparallelen Platten ein Puffervorhang der Dicke d gleichmässig in Fallrichtung bewegt. Das an einer Stelle kontinuierlich in den Pufferstrom injizierte Substanzgemisch wandert als Streifen der Bandbreite a nach unten.

Unter dem Einfluss eines elektrischen Gleichstromfeldes, dessen Feldlinien parallel zur Kante B verlaufen, werden die Substanzpartikel je nach ihrer Ladung abgelenkt. Ihre Wanderungswege bilden mit der Flussrichtung des Pufferstromes die Winkel usw., deren Grösse von den spezifischen Eigenschaften der Partikel, der Feldstärke und der Pufferflussgeschwindigkeit abhängt. Die Breite des Substanzgemisches ist vom Querschnitt der Kammer ( $B \times d$ ) sowie vom Verhältnis aus Dosiergeschwindigkeit des Substanzgemisches und der Pufferflussgeschwindigkeit abhängig. Sie vergrössert sich während der Trennung zu den Breiten  $a'$  bzw.  $a''$ . Die Bedingung für die vollständige Trennung zweier Substanzen ist erfüllt, wenn zum Zeitpunkt der Entnahme aus der Kammer  $a'$  und  $a''$  sich nicht überlappen und wenn die wirksame Breite b einer einzelnen Entnahmevorrichtung kleiner ist als der Abstand  $a'$  zu  $a''$ . Die Trennbarkeit von Substanzgemischen ist im Prinzip also nur von der konstruktiven Grösse b und den Variablen a,  $a'$ ,  $a''$  und #, nicht jedoch von Form und Ausmass der Trennkammer abhängig.

In den Fig. 2 und 3 ist eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemässen Trennkammer gezeigt. Die Trennkammer wird einerseits von einem Frontblock A, und zwei Seitenblöcken B begrenzt. Innerhalb dieser Blöcke liegt ein Küllblock C mit einem Kühlflüssigkeitskanal D, so dass sich insgesamt ein Uförmiger Querschnitt der Trennkammer ergibt. Den Seitenblöcken B und dem Kühl block C gegenüberliegend angeordnet ist ein Elektrodenblock E, der, gegenüberliegend den Enden der U-förmigen Trennkammer, Elektrodenkanäle F mit Elektroden enthält.

Zwischen dem Elektrodenblock und der Trennkammer sind kompressible Dichtungsleisten K (zum Beispiel aus Silicon), Elektrodenmembranen L und Ausgleichsleisten M angeordnet. Die Blöcke sind durch Spannbolzen G miteinander verspannt, wobei die durch die Seitenblöcke B führenden, Löcher als Langlöcher ausgeführt sind, so dass die Dicke der Trennkammer einstellbar ist. Ein durch den Elektrodenblock E hindurchgeführter Spannbolzen H dient zur Aufnahme der Kräfte die eine Verringerung der Kammerdicke bewirken würden. Die Kammerpufferlösung wird durch Kammerpufferzuführungen E zu- bzw. abgeleitet. Das zu trennende Substanzgemisch wird durch eine Zuführung P eingeleitet.

Der Elektrodenpuffer wird durch Anschlüsse N zu- bzw. abgeführt. Die Elektroden selbst sind mittels eingeschliffener Steckverbindungen in die Elektrodenkanäle eingesetzt, so dass sie einfach und schnell ausgewechselt werden können.

Die oben beschriebene Vorrichtung erlaubt eine Isolierung von Trennkammer und Elektrodenraum sowie hohe Feldstärken und lange Verweilzeiten in der Trennkammer. Dadurch kann die Vorrichtung so betrieben werden, dass man den Trennraum kontinuierlich mit einer Lösung eines geeigneten Tragerampholten mit der Lösung des zu trennenden Substanzgemisches beschickt, ein zur Ausbildung

eines pH-Gradienten genügend hohes Feld anlegt und die im pH Gradienten aufgetrennten Fraktionen aus den Entnahmeöffnungen der Trennkammer entnimmt.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung füllt man in die von der Trennkammer durch geeignete Membranen abgetrennten Elektrodenräume geeignete Flüssigkeiten ein, deren Acidität (Anodenraum) bzw. Basizität (Kathodenraum) den gewünschten Bereich des pH-Gradienten begrenzt; z.B. pH-Bereich 4 - 8, Anodenraum 1proz. Phosphorsäure, Kathodenraum 1,5proz. Wässrige Äthanolamin-Lösung.

Zweckmässig gibt man das zu trennende Substanzgemisch in die Trägerampholyt-Lösung, bevor diese in den Trennraum eintritt.

Vorzugsweise führt man das zu trennende Substanzgemisch vermittels einer Dosierpumpe in den Trennraum ein.

Beispiel Man durchströmt den Anodenraum mit 1proz. Phosphorsäure, den Kathodenraum mit 1,5proz. Äthanolaminlösung. Trennkammer und Elektrodenräume sind durch eine Dialysiermembran voneinander getrennt.

Die grosse mechanische Stabilität der Kammer gestattet es die Ampholyt-Lösung durch 6 Niveaugefässe der Trennkammer zuzuführen.

bei den handelsüblichen Trennkammersystemen werden hierzu die üblichen Kammerpufferzuführungen benutzt. Man kann die Einstellungsgeschwindigkeit des pH-Gradienten in Abhängigkeit von der Verweilzeit des Trägerampholyten in der Trennkammer bei Feldstärken von 90 - 100 V/cm bestimmen. Hierbei strömt die 1proz.

Ampholyt-Lösung aus den Niveaugefässen als 11 cm breiter und 0,05 cm dicker Pufferfilm durch die Kammer und wird nach einer Laufstrecke von 36 cm durch eine 48-fache Schlauchpumpe am unteren Ende der Kammer entnommen. Man beobachtet, dass die Leitfähigkeit, die bei Ampholytgradienten ein Mass für die Einstellung des pH-Gradienten ist, innerhalb von etwa 10 Min., abhängig von der Pufferflussgeschwindigkeit, auf 40 - 60 % des Ausgangswertes zurückgeht. Die Bestimmung des pH in den 48 Fraktionen ergab im Rahmen der methodischen Genauigkeit übereinstimmende pH-Gradienten bei Verweilzeiten von 25, 50 und 100 Min. Sie zeigten den erwarteten Verlauf.

Die unerwartet rasche Einstellung des pH-Gradienten in der Trennkammer lässt vermuten, dass die Herstellung des Gradienten und eine weitgehende isoelektrische Fokussierung in einem einzigen Durchlauf erreicht werden kann, wenn die Verweilzeit in der Trennkammer genügend gross ist. Diese Möglichkeit wurde an Hand der Trennungen von vier Proteinen, Serum-Albumin (Rind) (Behringwerke A.G., Marburg, elektrophoretischer Reinheitsgrad 100 %), Gamma-Globulin (Rind) (Behringwerke A.G., Marburg, reinst) (elektrophoretisch einheitlich (7)), Hämoglobin (Rind) (Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, 2 x kristallisiert, reinst) und Myoglobin (Pferd) (Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, reinst) geprüft.

Es wurden zwei Arten der Substanzzuführung in die Kammer angewendet: a) Auflösen des Proteins in der Ampholyt-Lösung eines der sechs Niveaugefässe. Bei einer Konzentration des Proteins von 1 mg/ml Ampholyt-Lsg., 100 Min. Verweilzeit und einem Kammer volumen von 20 ml werden pro Stunde 2 mg Protein durchgesetzt.

b) Zupumpen der Proteinlösung durch die Dosiereinrichtung. Bei einer Substanzkonzentration von 10 mg/ml Ampholyt-Lsg., einem Dosierverhältnis von Substanzlösung/Kammerpuffer = 1:50, einer Verweilzeit von 100 Min. werden ebenfalls etwa 2 mg Protein/Std.

getrennt.

Ergebnisse In Fig.4 ist die Trennung des Gamma-Globulins im pH-Gradienten von 3 - 10 dargestellt. Die punktierte Kurve stellt den Extinktionsverlauf bei 280 mμ in den verschiedenen Fraktionen nach einer Verweilzeit von 50 Min. dar. Injiziert wurde eine Globulinlösung von 5 mg/ml in 1proz. Ampholyt-Lösung im Dosierverhältnis 1:50. Die ausgezogene Kurve zeigt die Trennung nach doppelter Verweilzeit (100 Min.) und doppelter Proteinkonzentration. Das Trennergebnis war im letzteren Fall unabhängig davon, an

weicher Einlassstelle die Globulinprobe injiziert wurde. Dies zeigt, daß die erreichte Trennung zum mindesten eine sehr weitgehende Fokussierung der Globulinanteile mit unterschiedlichem IP in ihnen zukommenden pH-Bereich darstellt. Die gestrichelte Kurve gibt den in den Fraktionen ermittelten pI-Wert wieder.

Die Trennung des "elektrophoretisch einheitlichen" Serum-Albumins unter den Bedingungen der Globulintrennung mit 100 Min. Verweilzeit ist in Fig. 5 dargestellt. In flacheren pH-Gradienten zum pholine pH 6 - 8) wurden Myoglobin- und Hämoglobinslösungen (2,5 mg/ml) mit einer Verweilzeit von 100 Min. und einem Desiervverhältnis von 1:50 getrennt. Die punktierten Linien in Fig. 6 stellen die bei 415 nm, die durchgezogenen die bei 280 nm gemessenen Extinktionen dar. Aus Fig. 6 ist auch die ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der pH-Gradienten zu entnehmen, die durch die gestrichelten Linien repräsentiert werden.

Da die Trennung und Fraktionierung kontinuierlich erfolgt, können zu jedem Zeitpunkt Proben für Kontrollmessungen entnommen und so z.B. die Güte der Trennung laufend verfolgt werden. Wird bei so geringer Substanzkonzentration gearbeitet, dass keine Veränderung des Gradienten durch die Pufferwirkung der Substanz zu befürchten ist, so können die IP nacheinander getrennter Substanzen unmittelbar miteinander verglichen werden. Höhere Substanzkonzentrationen verursachen allerdings Störungen der Linearität des Gradienten (vgl. Fig. 4), so dass in diesem Fall der Verlauf des pH-Gradienten jeweils gesondert bestimmt werden muss.

Da im kontinuierlichen Verfahren weder ein Dichtegradient aufzubauen ist, noch nach erfolgter Trennung in einem besonderen Arbeitsgang fraktioniert werden muss, ist der Arbeits- und Zeitaufwand im Vergleich zum diskontinuierlichen Verfahren sehr gering; zumal die Trennung auf Grund der hohen anwendbaren Feldstärken rascher erfolgt als in der Trennsäule.

Die Trennungen wurden bisher ausschliesslich in 1proz. wässrigen Ampholine-Lösungen in der von uns entwickelten Trennkammer (8) ausgeführt. Wegen der geringen Dichte der Ampholine-Lösungen wurden nur wenig konzentrierte Proteinlösungen getrennt. Es besteht jedoch die Möglichkeit eines Dichtenausgleiches, z.B.

durch Rohrzucker, Picoll etc., bzw. durch apparative Veränderungen, an denen wir zur Zeit arbeiten.

Data supplied from the esp@cenet database - 12



## Claims

### Patent ansprUch e'

1. Trennkammer für die kontinuierliche Ablenkungselektrophorese im trägerfreien Pufferstrom, mit Elektroden, mit einer Trennkammer und Zu- und Ableitungen für den Elektrodenpuffer, den Kammerpuffer und die zu trennende

Substanz, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennkammer zwischen den Elektroden einen nicht ebenen, sondern einfach oder mehrfach gewinkelten oder gewölbten Querschnitt besitzt.

2. Trennkammer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden in einem gemeinsamen Block (E) zusammengefasst sind.

3. Trennkammer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Innenfläche der Trennkammer durch einen Innenblock (C) und ihre Aussenfläche durch einen Aussenblock (A, B) gebildet sind, wobei Innenblock, Aussenblock und Elektrodenblock zur Aufnahme von Kühlvorrichtungen vorgesehen sein können.

4. Trennkammer nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass Aussen- und Innenblock über Dichtungen (K) und Elektrodenmembranen (L) auf den Elektrodenblock (E) gepresst sind, wobei die elektrodenseitigen Kammerenden über den Schlitzen der Elektrodenräume liegen.

5. Trennkammer nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Aussenblock und Innenblock getrennt auf den Elektrodenblock preßbar sind.

6. Trennkammer nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennkammer einen U-förmigen Querschnitt aufweist, dass der Aussenblock aus einem Frontblock A und Seitenblöcken (B) besteht, und dass der Innenblock aus einem Kühlblock (C) besteht.

7. Trennkammer nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass ein durch den Elektrodenblock (E) führender Spannbolzen (-Y) vorgesehen ist, der den Kräften entgegenwirkt, die eine Verringerung der Kammerdicke bewirken würden.

8. Trennkammer nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Aussen- und Innenblock aus jeweils einem oder mehreren Teilen bestehen, durch deren gegenseitige Verschiebung Trennkammern variabler Dicke und Form hergestellt werden können.

9. Trennkammer nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden in die Elektrodenräume einsteckbar sind, wobei die Steckverbindungen die Abdichtung des Elektrodenkanals und die Justierung der Elektroden in den Elektrodenräumen bewirken.

10. Verfahren zum kontinuierlichen elektrophoretischen Trennen von Substanzen mit Ampholyteigenschaften, z.B. Proteine, mittels isoelektrischer Fokussierung, dadurch gekennzeichnet, dass man den Trennraum einer Trennapparatur nach einem der Ansprüche 1 bis 9 für trägerfreie Elektrophorese kontinuierlich mit einer Lösung eines geeigneten Trägerampholyten mit der Lösung der zu trennenden Substanzgemischs beschickt, ein zur Ausbildung eines pH-Gradienten genügend hohes Feld anlegt und die im pH-Gradienten aufgetrennten Fraktionen aus den Entnahmeöffnungen der Trennkammer entnimmt.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man in die von der Trennkammer durch geeignete Membranen abgetrennten Elektrodenräume geeignete Flüssigkeiten einfällt, deren Acidität (Anodenraum) bzw. Basizität (Kathodenraum) den gewünschten Bereich des pH-Gradienten begrenzt; z.B.

pH-Bereich 4 - 8, Anodenraum 1proz. Phosphorsäure, Kathodenraum 1,5proz. wässrige Äthanolamin-

Lösung.

12. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man das zu trennende Substanzgemisch in die Trägerampholyt- lösung gibt, bevor diese in den Trennraum eintritt.

13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man das zu trennende Substanzgemisch mittels einer Dosierpumpe in den Trennraum einführt.

---

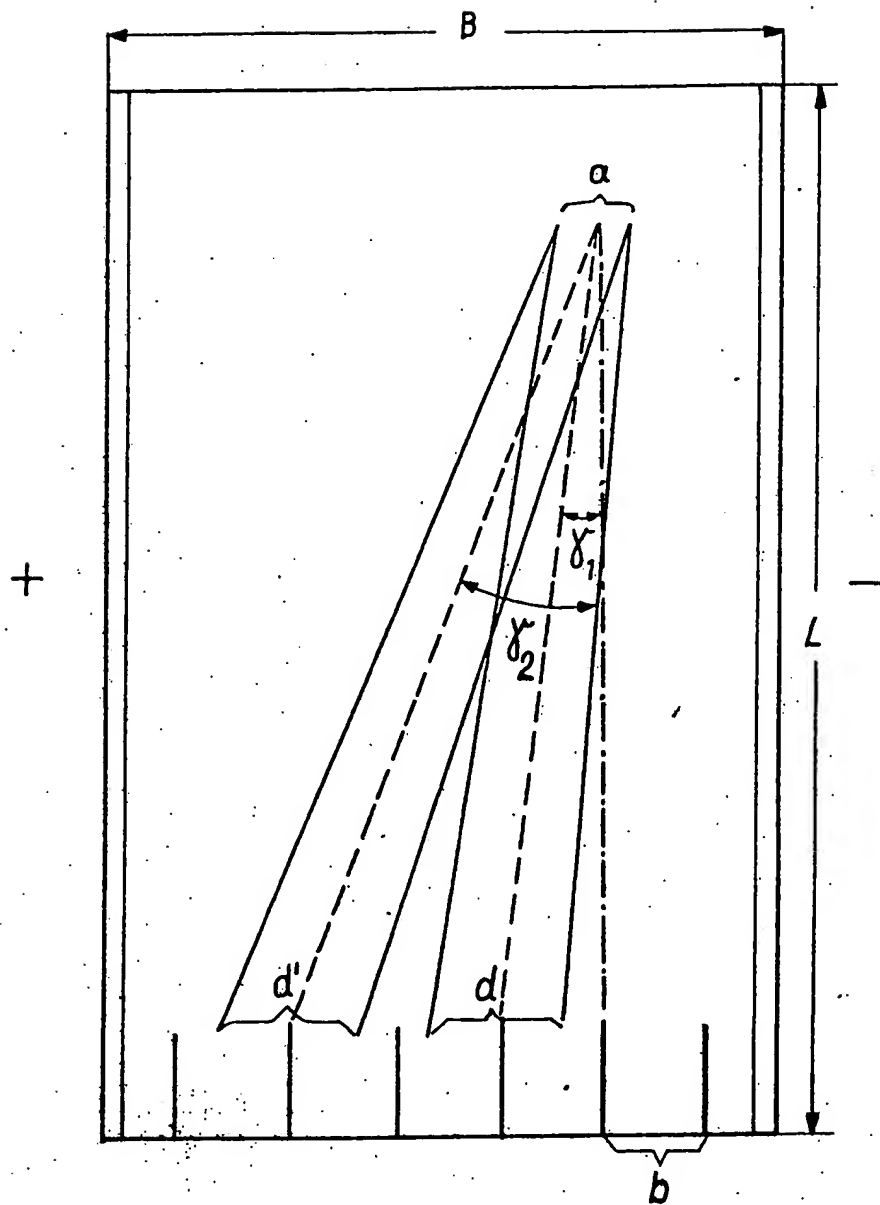
Data supplied from the esp@cenet database - I2

2051715

12 a 1-05 A1: 21.10.1970 O1: 27.04.1972

Fig.1

-01-



209818/0261

Fig. 2

- 16 -

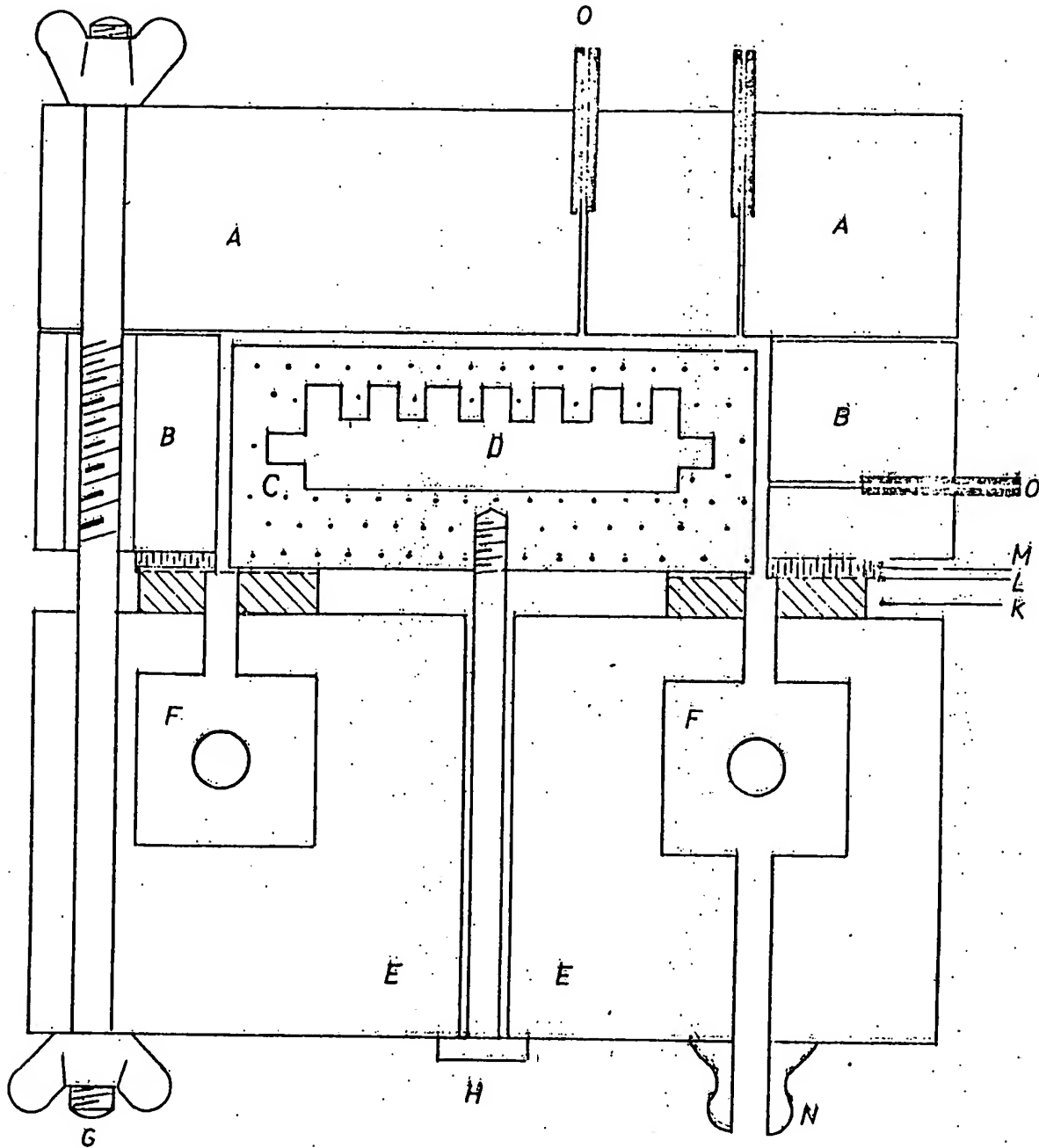
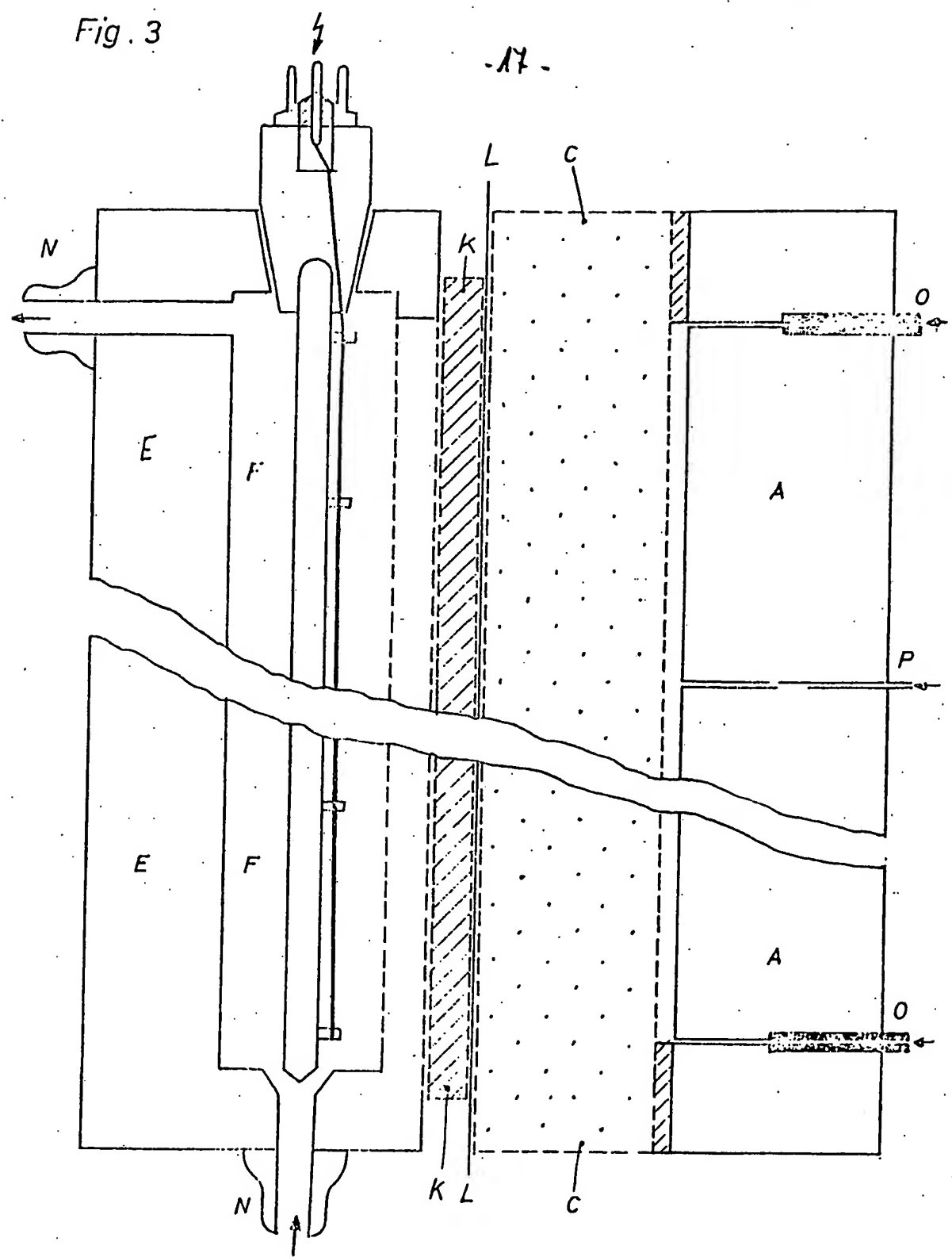
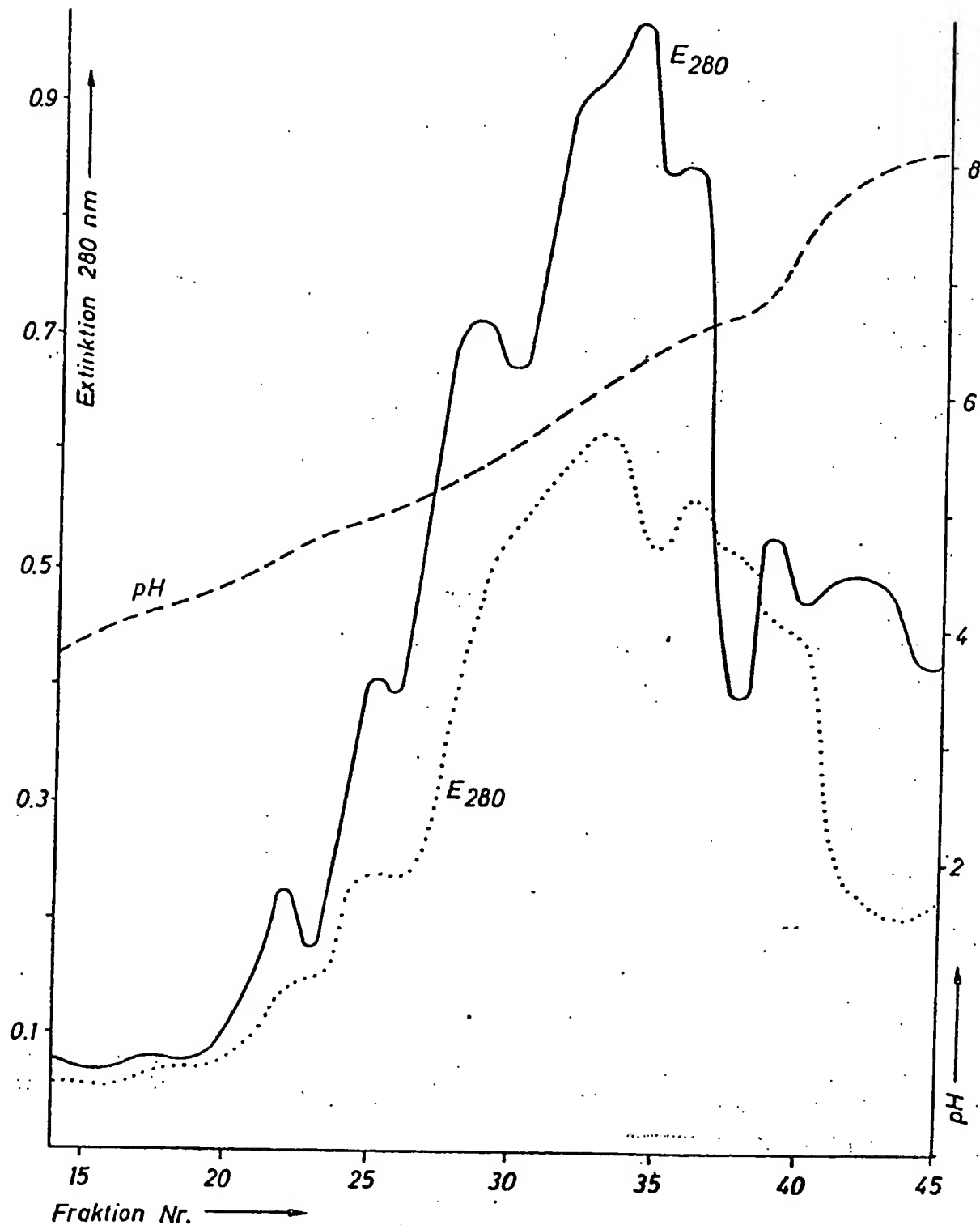


Fig. 3



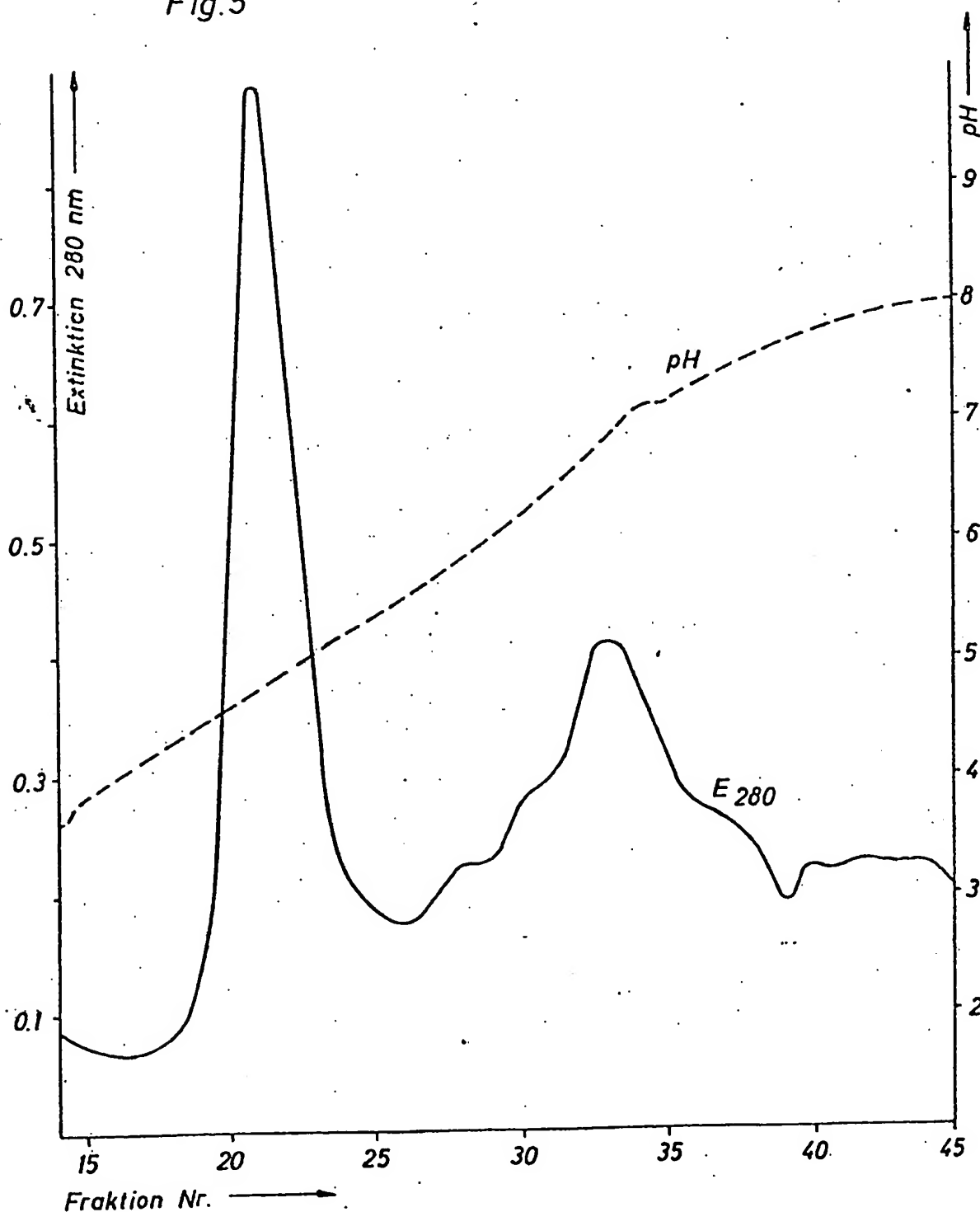
*...geändert am 2.8.61. 71  
für die ursprüngliche Fig. 4. 1. h.  
-12.*

Fig. 4



Ergebnisse von 28.07.71  
für die Analyse des Fig. 5.  
-19-

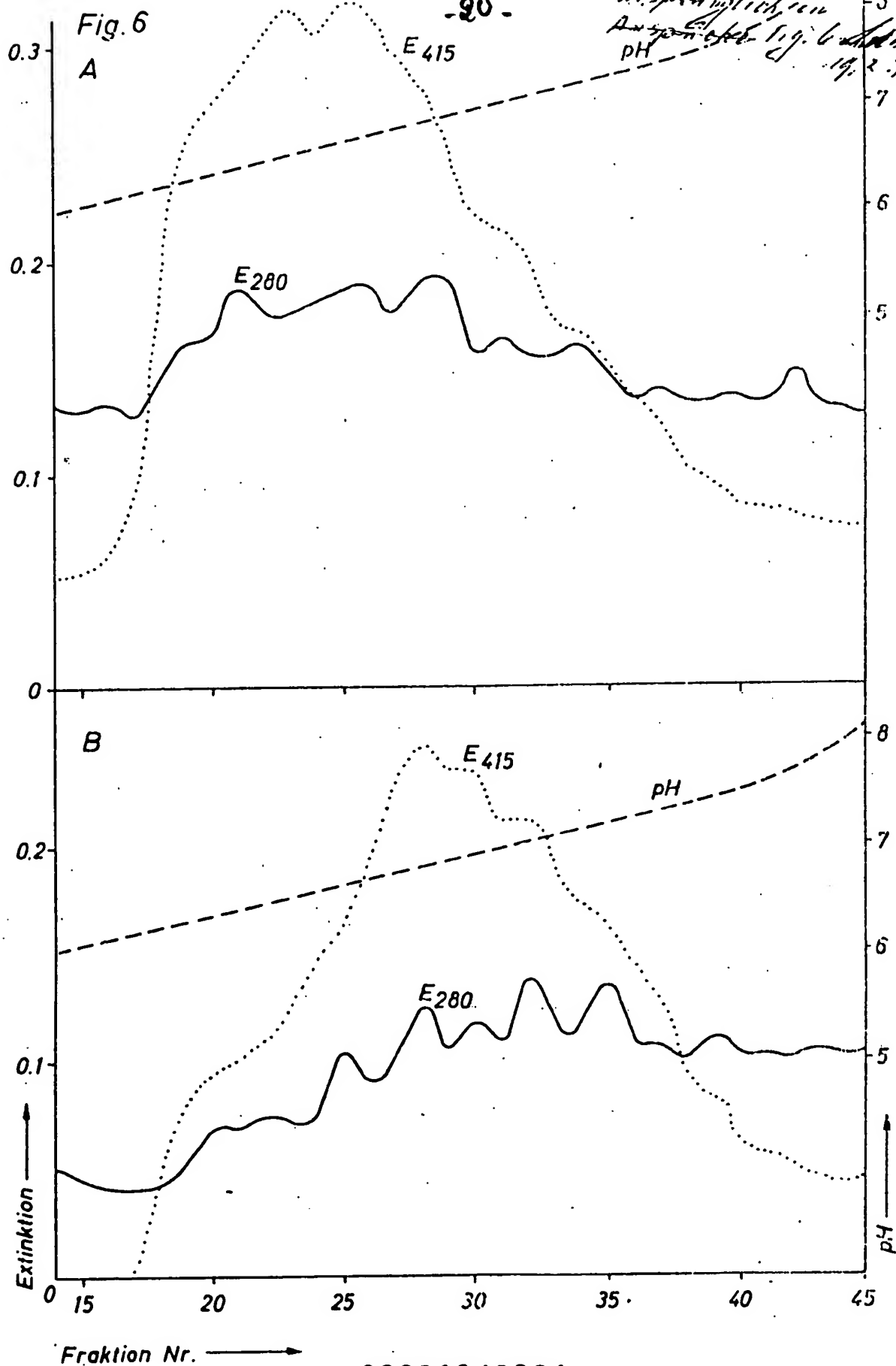
Fig.5



2051715

-20-

28.6.74 für die  
Vergleichsreihe  
Ausgangspunkt 1,9.6.74  
pH 19.2.77.



209818/0261



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**